

Anna Luiza Andriani

**Associação de uma variante do gene *IL28RA (IFNLRI)* com Artrite Reumatoide e suas manifestações clínicas em um estudo de caso controle em Santa Catarina**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de  
Licenciada em Ciências Biológicas.  
Orientadora: Dra. Sara Emelie Löfgren

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Andriani, Anna Luiza

Associação de uma variante do gene IL28RA  
(IFNLRL1) com Artrite Reumatoide e suas manifestações  
clínicas em um estudo de caso controle em Santa  
Catarina / Anna Luiza Andriani ; orientadora, Sara  
Emelie Löfgren, 2018.  
64 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Genética. 3.  
Associação. 4. IL28RA. I. Emelie Löfgren, Sara. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Ciências Biológicas. III. Título.

Anna Luiza Andriani

**Associação de uma variante do gene *IL28RA (IFNLRI)* com Artrite Reumatoide e suas manifestações clínicas em um estudo de caso controle em Santa Catarina**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciada em Ciências Biológicas” e aprovada em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 12 de novembro de 2018.

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

**Banca Examinadora:**

---

Dr.<sup>a</sup> Sara Emelie Löfgren  
Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dr.<sup>a</sup> Alice Heidrich Prompt  
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a meu pai, mãe, irmão e namorado que me deram todo o apoio nas horas difíceis para que eu pudesse chegar aqui.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu pai Luiz Fernando Andriani que mesmo após passar por um processo de transplante renal, fez questão de acompanhar todo o amadurecimento do trabalho, minha mãe Salete Motta, por sempre escutar meus choros e me incentivar a continuar com todo amor, meu irmão Luiz Felipe Andriani e toda minha família por me ajudarem a seguir em busca do meu sonho de me tornar uma bióloga. Gostaria de agradecer ao Celso Martins da Silveira Neto que esteve disposto a me apoiar quando eu achava que nada mais daria certo e toda sua família por ser uma segunda base pra mim. A minha orientadora Sara Emelie Löfgren por toda paciência, atenção e carinho no desenvolvimento do projeto. Meus parceiros de toda a vida: Sara Tavares, Nathália Born, Louise Enriconi, Isadora Igarashi, Luiz Platt, Júlia Fachin, Carolina Ecco e Thais Bracuhy, que sempre estiveram dispostos a me animar e incentivar. Meus amigos de curso por sempre estarem ao meu lado ao longo dessa jornada, Bruno Menna, Flávia Natividade, Fernanda Tiemy, Gabriel Vaisam, Kathleen Terhaag, Larissa Redivo, Tâmela Zamboni. Todos os colegas que estiveram comigo durante minha jornada acadêmica, pessoal da Simbiosis, amigos do laboratório de Citogenética-HU, Kátia do setor de compras, Ana Latorre, Fabiola Pozza, Jacqueline Graff, Lia Kubelka, Elisa Kubelka, Thalyane Kamezaki e André Saibro do laboratório Biogenetika e todas as pessoas que estiveram comigo durante essa jornada ajudando no meu engrandecimento pessoal e profissional. Agradeço também ao pessoal do LAPOGE, principalmente a Manuela Drehmer por sempre me auxiliar no desenvolvimento das minhas atividades e a minha banca, professora Dr<sup>a</sup> Yara Muniz, Dr<sup>a</sup> Alice Prompt e MSc Emily Justino. Por fim, mas não menos importante, a todos os meus bichinhos de estimação por sempre me alegrarem quando preciso.

## RESUMO

Doenças autoimunes (Das) são em sua maioria doenças complexas com etiologia não totalmente elucidada, mas que envolvem uma predisposição genética em combinação com fatores ambientais. Essa combinação de fatores pode levar a alterações no sistema imune, propiciando o desencadeamento de reações contra componentes próprios. Artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, caracterizada pela inflamação, deformidade e destruição das articulações por erosão do osso e cartilagem. Muitos genes foram relacionados à doença, como fatores de risco ao seu desenvolvimento. Alguns são comuns a diversas Doenças autoimunes e outros parecem ser específicos. Recentemente, o gene *IL28RA* foi identificado como um fator de suscetibilidade para o desenvolvimento de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em população chinesa e desenvolvimento de psoríase em população europeia. Nosso objetivo neste estudo foi o de verificar a possível associação de uma variante nesse gene com AR e suas manifestações clínicas em uma população brasileira. Foram analisadas amostras de DNA genômico de pacientes com AR e controles. A genotipagem do SNP *rs4649203* foi realizada por PCR quantitativa em tempo real através do método *TaqMan® Genotyping Assays*, e assim as frequências alélicas e genotípicas puderam ser determinadas. O genótipo AA foi associado à AR na população masculina como fator de risco (OR=11,66,  $p=0,0047$ ). Analisando ambos os sexos, foi possível identificar associação de risco com o genótipo AA e algumas manifestações clínicas de AR: a presença de vasculite reumatoide (OR=4,76,  $p=0,038$ ), a velocidade de hemossedimentação (OR=2,99,  $p=0,047$ ) e também para a elevação da proteína C reativa (OR=2,44  $p=0,012$ ). Assim, verificamos que além de psoríase e LES este gene está também associado ao desenvolvimento de AR, podendo se tratar de um fator de risco para o desencadeamento de processos autoimunes basais. Pela primeira vez foi identificada essa associação em uma população sul americana.

**Palavras-chave:** Associação genética; *IL28RA*; Artrite reumatoide.

## ABSTRACT

Autoimmune diseases are mainly complex diseases with unclear etiology but that involves a genetic predisposition in combination with environmental factors. This combination of factors can lead to dysregulation of the immune system and tissue damage. Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterized by inflammation, deformity and destruction of the joints by erosion of bone and cartilage. Many genes have already been linked to the disease as risk factors for its development. Some are common to several autoimmune diseases while others seem to be more specific. Recently, the *IL28RA* gene has been identified as a risk factor for the development of systemic lupus erythematosus (SLE) and psoriasis in a Chinese and European population. The aim of this study was to investigate the possible association of a variant in this gene also with RA and its clinical manifestations in a Brazilian population. Genomic DNA of patient with RA and controls with no evidence of autoimmune diseases were analyzed. Genotyping of SNP *rs4649203* was performed by quantitative real-time PCR with the TaqMan® Genotyping Assays method, and the allele and genotype frequencies were determined. The variant was not associated with the disease *per se* but the *rs4649203-AA* genotype was associated in the male individuals as a risk factor (OR=11,66,  $p=0,0047$ ). Analyzing both sexes, it was possible to identify a risk association with some clinical manifestations of RA, elevated erythrocyte sedimentation rate (OR=2,99,  $p=0,047$ ) and C reactive protein (OR=2,44  $p=0,012$ ) levels as well as with the presence of rheumatoid vasculitis (OR=4,76,  $p=0,038$ ). Thus, in addition to psoriasis and SLE, our results suggest that this gene may also be associated with RA, and may hence be a common a risk factor for autoimmunity. And for the first time this association was identified in a Brazilian population.

**Key-words:** Genetic association; *IL28RA*; Rheumatoid Arthritis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação básica dos principais mecanismos envolvidos na imunidade inata e adaptativa .....	15
Figura 2 Comparação entre articulações de uma pessoa normal e uma com AR .....	20
Figura 3 Progressão de AR.....	21
Figura 4 Localização do gene <i>IL28RA</i> .....	25
Figura 5 Estrutura do gene <i>IL28RA</i> .....	25
Figura 6 Modelo de curva homozigota.....	34
Figura 7 Modelo de curvas heterozigotas.....	34



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Critérios classificatórios para AR.....	22
Tabela 2 Processo de genotipagem por qPCR.....	33
Tabela 3 Material para genotipagem de uma amostra.....	35
Tabela 4 Caracterização dos pacientes com AR.....	37
Tabela 5 Distribuição das frequências alélicas e genotípicas entre controles e pacientes com AR analisando todos os indivíduos .....	38
Tabela 6 - Distribuição da frequência alélica e genotípica e testes de associação entre controles e pacientes com AR separados por gênero .	39
Tabela 7 Associação com os autoanticorpos presentes nos pacientes com AR .....	41
Tabela 8 Associação com as manifestações de AR.....	42

### **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AR- Artrite Reumatoide  
Anti-CCP- Anticorpo anti-peptídeo citrulinado  
CD- Células dendríticas  
DAMP's- Padrões moleculares associados a dano  
DA- Doenças Autoimunes  
DAS- Disease Activity Score  
FR- Fator Reumatoide  
IFN- $\gamma$ - Interferon  $\gamma$   
IL- Interleucina  
LAPOGE- Laboratório de polimorfismos genéticos  
LB- Linfócitos B  
LES- Lúpus Eritematoso Sistêmico  
LT- Linfócitos T  
MEA- Manifestação extra articular  
MHC- Complexo principal de histocompatibilidade  
NK- Natural Killer  
PAMP's- Padrões moleculares associados a patógenos  
PCR- Proteína C reativa  
PRR's- Receptores de reconhecimento padrão  
qPCR- PCR quantitativa em tempo real  
TNF- Fator de necrose tumoral  
Treg- Linfócitos T regulatórios  
VHS-Velocidade de hemossedimentação  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

## **SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO	13
1.2 AUTOIMUNIDADE	16
1.3 DOENÇAS AUTOIMUNES	17
1.4 ARTRITE REUMATOIDE	18
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	21
1.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	21
1.7 GENE IL28RA	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	27
<b>3 OBJETIVOS</b>	299
3.1 OBJETIVO GERAL	299
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	299
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	31
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	31
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	31
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA	32
4.4 GENOTIPAGEM	32
4.5 ESTATÍSTICA	35
<b>5 RESULTADOS</b>	37
<b>6 DISCUSSÃO</b>	43
<b>7 CONCLUSÕES</b>	47
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	49
ANEXO A - Termo de esclarecimento	53
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido	55
ANEXO C - Questionário aplicado nos pacientes com ar	56
ANEXO D - Questionário para medir a gravidade da doença nos pacientes	59
ANEXO E - Questionário de identificação do grupo controle	61



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico é responsável por proteger o organismo dos seres vivos, a fim de evitar o desencadeamento e evolução de doenças causadas por agentes infecciosos e células tumorais ou transformadas. A espécie humana possui dois tipos de mecanismos de defesa quando se trata de sistema imunológico: a imunidade inata e a adaptativa. A **Figura 1** traz um pouco dos mecanismos de defesa utilizados por cada uma das duas. A inata é caracterizada por não possuir memória e é responsável pela primeira linha de defesa do corpo, e a adaptativa (adquirida ou específica), é a defesa que apresenta como características a especificidade do reconhecimento, capacidade de memória e resposta específica através da ativação de células mais especializadas e produção de anticorpos (ABBAS; LICHTMAN, 2009).

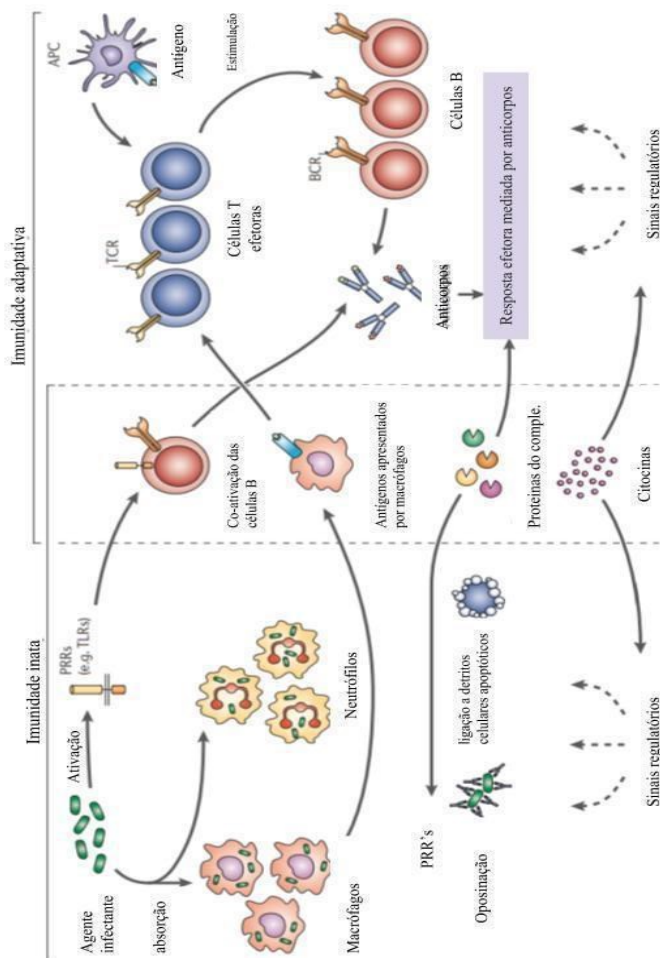
A imunidade inata é responsável pela proteção inicial do organismo e, normalmente, gera uma resposta inespecífica, de amplo espectro. Os principais componentes celulares constituintes da imunidade inata são as células NK (do inglês, *Natural Killer*), os fagócitos, neutrófilos e as células dendríticas (CD). Também esta constituída por outros mecanismos como o de receptores de reconhecimento padrão (PRR'S), padrões moleculares associados a patógenos (PAMP'S), essenciais para a sobrevivência dos microrganismos invasores, e por padrões moleculares associados a danos (DAMP'S). As células da imunidade inata reconhecem estruturas presentes em antígenos dos patógenos e ativam eventos de transdução de sinal para promover diversos mecanismos de defesa, como: liberação de mediadores inflamatórios e antimicrobianos, fagocitose, ativação de proteínas do sistema complemento e síntese de citocinas e quimiocinas (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

A imunidade adaptativa ou adquirida se caracteriza pelo desenvolvimento de uma resposta imune específica, de forma mais lenta e de longa duração e normalmente após o contato com o patógeno ou antígeno. O reconhecimento do agente patogênico é realizado por meio dos receptores de antígenos, presentes na superfície dos linfócitos T (LT) e dos linfócitos B (LB). Quando o LB é ativado ele é diferenciado em células efectoras, os plasmócitos, ou células de memória. O plasmócito é responsável pela produção de anticorpos que vão auxiliar os fagócitos no reconhecimento dos microrganismos, e também ativam o sistema complemento, entre outros mecanismos. Os LB, além de se diferenciarem em células secretoras de anticorpos, podem apresentar antígenos para os LT auxiliares (LT CD4+), desencadeando sua

coestimulação, e expressar citocinas pró ou anti-inflamatórias, modulando as respostas dos linfócitos T (LORENZI; LORENZI; ZANETTE, 2012).

Os LT se dividem basicamente em TCD8+ (citotóxico), responsável por combater células infectadas ou neoplásicas, e o TCD4+ também conhecida como T helper que se dividem em subpopulações de células efectoras possuindo diferentes funções imunes, baseados em seus padrões de produção de citocinas (GREGERSEN; BEHRENS, 2006). São principalmente os linfócitos Th1, que produzem interleucina 2 (IL2), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e promovem a imunidade celular contra patógenos intracelulares. Os linfócitos Th2 produzem diversas interleucinas que promovem a imunidade humoral, importantes contra patógenos extracelulares. Os linfócitos Th17, por sua vez produzem potentes citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-17 (IL17), importantes na promoção dos processos inflamatórios. O último grupo mais conhecido é o dos LT regulatórios (Treg), cuja função é modular as respostas das células T, principalmente através da indução e manutenção da tolerância periférica, com importante papel na prevenção da autoimunidade (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

**Figura 1 Representação básica dos principais mecanismos envolvidos na imunidade inata e adaptativa**



Fonte: Imagem adaptada de (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

## 1.2 AUTOIMUNIDADE

Hoje, é relativamente comum a ocorrência de algum tipo de desordem autoimune, principalmente na população ocidental. O sistema imune tende a manter o corpo em um estado de homeostase constante, isto é, em equilíbrio, e ele realiza isso por meio de diversos mecanismos. A tolerância diz respeito à capacidade do organismo em diferenciar o que faz parte dele e o que é externo. Para isso o organismo realiza testes a fim de identificar linfócitos que apresentam auto reatividade, que são então eliminados ou inativados após encontrar antígenos próprios através de mecanismos (MORI; LIMA, 2008).

A auto tolerância imunológica é definida como a falta de resposta a antígenos do próprio organismo e é um processo ativo que ocorre principalmente nos órgãos linfoides centrais, com o intuito de impedir que o sistema imune reaja contra antígenos do próprio organismo, mantendo a homeostasia do hospedeiro. A tolerância central é testada no local de amadurecimento dos linfócitos, como o timo para os LT e medula óssea para os LB, e se houver uma falha, há controles posteriores nos órgãos linfoides periféricos (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Durante o processo de maturação, atuam mecanismos de seleção positivos e negativos dos linfócitos. Em adição, os LB podem sofrer um processo chamado de edição de receptor, no qual ocorre uma recombinação gênica alterando seus receptores de forma que ele não reconheça mais um antígeno próprio, mas sim os não próprios (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Os LTs imaturos migram ao timo, onde irá ocorrer o amadurecimento e posterior migração aos tecidos periféricos. No timo se ele for reconhecido como auto reativo, ele pode sofrer apoptose ou ainda, células do tipo CD4+ podem se transformar em uma LT regulatória (LORENZI; LORENZI; ZANETTE, 2012).

Podem ocorrer falhas na tolerância central e em alguns casos os linfócitos auto reagentes podem não ser reconhecidos e seguir para os órgãos periféricos. O linfócito auto reativo eventualmente pode encontrar nos tecidos o antígeno a que é reagente, mas pode ser neutralizada por mecanismos de tolerância periférica como a inativação funcional (anergia), a supressão imune por células T reguladoras ou a deleção (morte celular induzida por ativação) (MORI; LIMA, 2008).

Reações de autoimunidade ocorrem frequentemente e é um processo normal, em níveis controlados. Essas respostas ocorrem em decorrência da desregulação do sistema imune como uma falha no mecanismo de apoptose, a perda da anergia da célula T, defeito na regulação de linfócitos Th1 e Th2, falha do LT supressor, entre outros (LORENZI; LORENZI; ZANETTE, 2012). Quando esses processos



passam a se apresentar de forma descontrolada e levam a danos ao organismo como consequência dessas reações, caracteriza-se esse quadro como uma doença autoimune. Normalmente esse processo envolve ativação de linfócitos auto reativos, falhas nos processos de tolerância imunológica, processos inflamatórios crônicos e muitas vezes como um ciclo de amplificação, falhas na eliminação de restos celulares e no sistema complemento e eventualmente danos aos próprios tecidos (MACHADO et al., 2004).

### 1.3 DOENÇAS AUTOIMUNES

As doenças autoimunes (DAs) englobam mais de 80 desordens, que como um grupo são frequentes, afetando em torno de 5% da população ocidental. Essas doenças possuem uma etiologia multifatorial, isto é, envolvem uma interação de predisposição genética com fatores ambientais, como cigarro, álcool, por exemplo, que junto a alterações no sistema imune, levam ao desencadeamento desse grupo de doenças (MARQUES, 2011). O alvo da auto reatividade, que é reconhecido por uma população de células T auto reativas ativadas por células dendríticas (CD) ou outras células que também apresentam auto antígenos. Pode ser uma doença sistêmica, afetando diversos órgãos, como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatoide, ou pode ser um tipo celular, órgão ou tecido específico como a psoríase e diabetes do tipo 1 (SOUZA et al., 2010).

Como consequência do defeito na eliminação de linfócitos B e T autor reativos, as DAs são caracterizadas por uma ampla variedade de distúrbios imunológicos como o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuição das citocinas anti-inflamatórias e o aumento do número de linfócitos B e produção de autoanticorpos (HAMPE, 2012; MESCOUTO MELO; TAVARES COSTA CARVALHO, 2009).

A contribuição genética varia de acordo com a doença e de paciente para paciente. Porém sugere-se que estejam envolvidas dezenas de variantes genéticas, cada uma com uma contribuição modesta para o desenvolvimento da doença. Estima-se que a genética seja responsável por aproximadamente 40-60% da etiologia da maioria das DAs e que provavelmente é necessário um gatilho ambiental ou endógeno para que ela se manifeste. Gatilhos esses não muito bem conhecidos e provavelmente muito heterogêneos entre os pacientes (ERCOLINI; MILLER, 2009).

Assim, os mecanismos envolvidos na etiologia dessas doenças não são totalmente elucidados. Por conta da complexidade do nosso sistema imunológico, e dos fatores particulares responsáveis em cada

paciente, as DAs costumam ser fenotipicamente muito heterogêneas, possuindo assim um diagnóstico dificultoso (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

DAs podem ser classificadas pelo tipo de resposta imune que acarreta o início da doença, podendo esta ser humoral acometida por auto anticorpos ou celular relacionadas com linfócitos T auto reativos. Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) podem predispor ao desenvolvimento de DAs por vários mecanismos como, por exemplo: modelação do repertório dos receptores e células T; apresentação de peptídeos; ativação de clones auto reativos; entre outros. Antígenos de classe II vêm sendo estudados, porque essas moléculas estão envolvidas na ativação de linfócitos T CD4 e esses regulam tanto a resposta humoral quanto a celular. Os produtos gênicos da classe II do MHC são polimórficos e apresentam funções tanto na apresentação de antígenos para o LT, como na indução de tolerância. Alelos relacionados com a deficiência do sistema complemento vêm sendo relacionados com o desenvolvimento de DAs (WASTOWSKI; CARVALHO; DONADI, 2009).

#### 1.4 ARTRITE REUMATOIDE

A Artrite Reumatoide (AR) é uma DA sistêmica caracterizada por um processo inflamatório crônico, que leva à deformidade e destruição das articulações por erosão do osso e cartilagem, que pode comprometer fortemente o bem-estar do indivíduo (LAURINDO et al., 2004). Os mecanismos de inflamação nas articulações dos pacientes e da progressão de AR tem ligação com diversos fatores do sistema imunitário, sendo estes células T, células B, macrófagos, neutrófilos e fibroblastos sinoviais (ANDERSSON; LI; BRENNAN, 2008).

A maior prevalência da doença ocorre em mulheres, com idade reprodutiva, entre 30 e 50 anos (MOTA et al., 2011). A prevalência mundial varia entre 0,24 e 1% da população e representa a 42ª causa de debilidade global (GOELDNER; SKARE; REASON, 2011; WHO, 2018). Tobón et al (2010) sugere que o cigarro é o fator ambiental que mais está ligado ao desenvolvimento da forma grave da doença. Além de fatores ambientais e genéticos, sugere-se que seria necessária a presença de um antígeno para dar início (gatilho) ao processo inflamatório, como infecções por microrganismos que tendem a influenciar no desencadeamento de AR por meio de mecanismos (SCODELER; REZENDE, 2016). A membrana sinovial apresenta nos pacientes com AR, um processo inflamatório intenso caracterizado por hipertrofia do tecido e transformação funcional das células componentes

desta membrana. O tecido inflamatório recebe o nome de “*Pannus*”. Esse tecido cresce em cima da cartilagem, ligando-se a ela de tal forma que não é possível ser retirado. Também há a formação de novos vasos sanguíneos que são importantes para o processo de proliferação da sinóvia (REGO, 2010).

Os fatores genéticos responsáveis pelo desencadeamento de AR podem ser classificados em dois grupos, o dos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e das regiões não MHC (CASTRO-SANTOSA; DÍAZ-PEÑA, 2016).

Em pacientes com AR há a produção de autoanticorpos como o fator reumatoide (FR) e o anti-peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP), porém nenhum deles é específico e por isso não podem ser usados como marcadores eficientes da doença. O FR é um anticorpo encontrado também em outras DAS e que reage contra a porção Fc da IgG, formando imunocomplexos que se depositam e recrutam células de defesa e estimulam o processo inflamatório, destruindo o tecido, como a cartilagem das articulações. O anti-CCP aparentemente é mais específico para AR, e em muitos casos ele pode ser identificado na fase inicial de AR e também pode estar relacionado com o desenvolvimento da doença de forma grave. Ele não está presente em todos os pacientes e é encontrado em uma pequena fração de pacientes com outras DAS (DA MOTA et al., 2009).

Os mecanismos inflamatórios decorrentes estão relacionados com diversas citocinas que possuem efeito pró-inflamatório como o TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17 (SOUZA et al., 2010). IL-17 é uma citocina pró inflamatória secretada por células T e aumentadas em sinóvias de AR, ela pode aumentar a produção de IL-6 e contribuir para destruições articulares (LING; PUEL, 2014). A expressão da proteína IL-8 é detectada em pessoas que possuem AR, pois sua função é estimular a liberação de grânulos neutrófilos (AN et al., 2018).

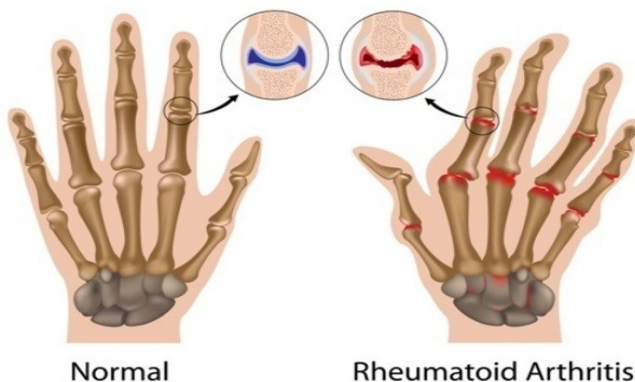
A IL-6 é a chave para aumentar a diferenciação para Th17 e inibir para Treg (GEORGANAS et al., 2000). Em AR, assim como em várias outras Das, há uma diminuição do número e/ou da funcionalidade das células Treg (GOELDNER; SKARE; REASON, 2011).

Ocorre o recrutamento de macrófagos que aderem as células do endotélio liberando fatores que vão estimular a migração das células. O processo inflamatório e o desenvolvimento da AR são mantidos pela produção de citocinas pelos macrófagos. Há um aumento da proliferação celular bastante intensa, formando tecido granulomatoso e também o processo inflamatório na articulação sinovial que se instala e desenvolve a sinovite. Interação entre macrófagos e leucócitos na sinóvia gera uma

resposta Th1 que libera TNF-alfa ou IL-1 causando a inflamação da membrana sinovial (ALTMAN, 2018).

Células endoteliais são ativadas para expressar moléculas de adesão enquanto as citocinas e fatores de crescimento produzidos induzem a produção de mais células inflamatórias criando um infiltrado linfocitário. Enzimas são produzidas dentro das articulações por conta da quantidade exacerbada de fagocitose, elas clivam o colágeno, gerando o edema articular. Posteriormente, ocorre a proliferação dos linfócitos T, além de aumento na produção de linfócitos B. O desequilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos levando uma reabsorção óssea patológica, que pode ser visto em AR (ZHANG et al., 2013). As erosões ósseas são um processo irreversível que ocorre precocemente na doença. As células continuam a se proliferar até que invadem o tecido cartilaginoso (MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010).

**Figura 2 Comparação entre articulações de uma pessoa normal e uma com AR**



A imagem apresenta um contraste entre duas mãos, a da esquerda sem nenhum indício de inflamação e a da direita afetada por AR

Fonte: (ALILA MEDICAL MEDIA, [s.d.]).

### Figura 3 Progressão de AR



## Desencadeamento da inflamação das articulações.

Fonte: (PROJETADO POR BRGFX - FREEPIK.COM, [s.d.]).

## 1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A artrite reumatoide (AR) é caracterizada por poliartrite periférica, que leva à deformidade e à destruição das articulações. Isto ocorre por conta das erosões ósseas e das cartilagens. O dano articular associado à AR tende a ocorrer dos dois lados do corpo, e essa simetria pode ajudar em seu diagnóstico (LOUZADA et al., 2007).

Por ser uma doença sistêmica, ela pode ter também manifestações extra-articulares (MEA). De acordo com a revisão bibliográfica realizada por ATAÍDE (2009), as MEAs mais citadas pela literatura são: nódulos reumatoides, a síndrome de Sjögren e as alterações cardiovasculares.

Com a progressão da doença, os pacientes, frequentemente afetados em seus anos mais produtivos, desenvolvem incapacidade para realizar suas atividades, tanto da vida diária como profissional, com impacto significativo para o paciente e para a sociedade (ASSIS; SERAFIM, 2016).

## 1.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico de AR é dificultoso e realizado através de métodos clínicos, sem marcadores específicos disponíveis. O tempo

médio desde o início dos sintomas articulares até o diagnóstico de AR é de 54 meses. Metade dos pacientes é avaliada por dois ou mais médicos antes de ser encaminhado para a reumatologia. Isso porque é uma doença sistêmica bastante heterogênea, com diversas manifestações clínicas nas articulações além de extra articulares que variam amplamente entre os pacientes (LAURINDO et al., 2004).

Uma lista de quatro critérios foi desenvolvida para auxiliar na investigação e em sua classificação, sendo estes: acometimento articular, sorologia, duração dos sintomas e provas de atividade inflamatória (Tabela 1). Dentro de cada critério, existe uma série de manifestações clínicas contando pontuações que ocorrem através de soma direta. Ao atingir a soma 6, o paciente é diagnosticado com AR (MOTA et al., 2011).

O DAS28 ou Índice de atividade da doença (*Disease Activity Score*) é um cálculo que utiliza 28 articulações afetadas. Além disso, marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa (PCR) ou a velocidade de hemossedimentação (VHS), também podem auxiliar na determinação da atividade. O DAS 28 se tornou o critério mais usado para avaliação da inflamação e gravidade e atividade da doença (MEDEIROS et al., 2015). O reconhecimento precoce de AR tem uma significativa importância nas perspectivas de melhora e tratamento da doença. Entretanto, mesmo pacientes com que estejam com AR em estado de remissão podem apresentar inflamações das articulações (BROWN et al., 2006).

**Tabela 1 Critérios classificatórios para AR**

<b>Critérios classificatórios para AR 2010 ACR/ EULAR</b>
<b>População- Alvo (quem deve ser testado)</b>
<b>Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida</b>
Acometimento articular
1 grande articulação 0
2-10 grandes articulações 1
1-3 pequenas articulações (grandes não contadas) 2
4-10 pequenas articulações (grandes não contadas) 3

> 10 articulações (pelo menos uma pequena) 5
<b>Sorologia (0-3)</b>
FR Negativo E ACPA Negativo 0
FR Positivo OU ACPA positivo em baixos títulos 2
FR Positivo OU ACPA positivo em altos títulos 3
<b>Duração dos sintomas (0-1)</b>
< 6 semanas 0
≥ 6 semanas 1
Provas de atividade inflamatória (0-1)
PCR normal E VHS normal 0
PCR anormal OU VHS anormal 1
Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente de AR. O domínio do <b>acometimento articular</b> refere-se a qualquer articulação dolorosa ou inchada (excluindo Interfalanges distais dos pés e mãos, primeira metarsofalangeana e primeira carpometacarpena). Consideram-se para fins de classificação <b>pequenas articulações</b> , as metacarpofalangeanas, Interfalangeanas proximais, metarsofalangeanas, ombros, cotovelos, quadril, joelhos, tornozelos. <b>Articulações adicionais</b> desde que uma articulação pequena esteja acometida podem ser contadas na avaliação de mais de 10 articulações, sendo elas: tempromandibular, esternoclavicular, acromioclavicular, entre outras. No domínio <b>sorologia</b> , considera-se o resultado de fator reumatoide ou de anticorpos anti-peptídeo citrulinado negativo se o valor for igual ou menor ao limite superior da normalidade para o respectivo laboratório. Positivo baixo se o resultado se o resultado for encontrado for maior que o limite superior da normalidade, mas menor ou igual a 3 vezes o limite superior da normalidade e positivo alto quando o valor encontrado for superior a 3 vezes o limite superior da normalidade. O domínio <b>duração dos sintomas</b> refere-se ao relato do próprio paciente quanto à duração máxima dos sinais e sintomas de qualquer articulação que esteja clinicamente envolvida no momento da avaliação; Já as provas de atividade inflamatória (VHS ou PCR) são consideradas normais ou anormais de acordo com o valor de referência do laboratório utilizado.

A tabela traz todas as características que são analisados para a detecção da doença através de uma pontuação estabelecida para cada sintoma.

Fonte: Adaptado de (MOTA et al., 2011).

A AR inicial poderia ser definida como uma oportunidade terapêutica, podendo modificar a evolução da doença, sendo o prognóstico melhor do que em fases mais tardias. (MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010). A doença não tem cura, mas pode ser tratada de forma basicamente inespecífica com anti-inflamatórios, corticoides e drogas imunossupressoras. Sendo uma doença complexa, cada paciente possui vias etiológicas diferentes, e assim os pacientes respondem de forma variada aos tratamentos (FIRESTEIN, 2014).

Além da variabilidade na eficácia os tratamentos também levam a diversos efeitos adversos. Algumas drogas inibidoras do TNF-alfa são utilizadas no tratamento da doença e diminuem a resistência às infecções quando associado com outras drogas imunossupressoras. Por conta disso, muitos pacientes com AR são suscetíveis a infecções, isso significa cuidados especiais em pacientes que fazem tratamento com estes medicamento (MANGINI; DE MELO, 2003). Por não ter cura, o principal objetivo do tratamento com os medicamentos é a prevenção e controle das lesões, além de diminuição das dores para que o paciente possa ter uma melhor qualidade de vida (LOUZADA et al., 2007).

### 1.7 GENE *IL28RA*

Polimorfismos nos genes para receptores de citocinas apresentam riscos elevados para o desenvolvimento de DAs (VANDENBROECK, 2012). Os diferentes genes e fatores envolvidos na doença mostram o quão complexa elas se apresentam (FIRESTEIN, 2014). Ter uma etiologia desconhecida é mais um dos motivos pelos quais a identificação dos genes envolvidos é tão difícil de ser realizada. Entretanto, muitos genes foram associados à essas doenças, como fatores de risco ou protetivos ao seu desenvolvimento, e alguns são comuns a várias DAs e outros parecem ser específicas a uma ou poucas DAs.

Dentre esses, o gene *IL28RA* foi associado recentemente como um fator de risco para o desenvolvimento de várias DAs (LI et al., 2013; STRANGE et al., 2010; YANG et al., 2013). Esse gene está localizado no cromossomo 1, na posição 1p36.11. A estrutura da proteína transmembranar codificada por ele, se encaixa com outra subunidade formando um complexo receptor de classe II (NCBI, 2018). Este receptor é utilizado como alternativa para as citocinas IL-28A, IL-28B e IL-29 denominadas interferons de classe III que são ativados principalmente após a infecção viral (SHEPPARD et al., 2003).

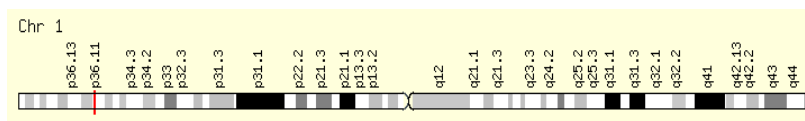


A via de interferons se mostrou importante no desenvolvimento de distúrbios autoimunes já que além de vírus, podem ser ativadas também por fatores internos e quando está super ativa, aumenta a expressão de potentes fatores pró-inflamatórios. Assim, polimorfismos em genes que integram esta via, são intensamente estudados e *IL28RA* já foi relacionada com doenças como rinite alérgica (CHAE et al., 2006) e em pacientes com LES, a expressão do RNA mensageiro de *IL28RA* se mostrou aumentada em relação a indivíduos saudáveis, sugerindo uma possível participação deste gene na etiologia da doença (CHENG et al., 2015).

A variante escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) *rs4649203*, localizado na porção 3'UTR (região não-traduzida) do gene. Essa variante foi identificada no ano de 2010 em um estudo de associação genômica ampla (GWAS) como um fator de risco com o alelo A para o desenvolvimento de psoríase, em uma população europeia (STRANGE et al., 2010). Foi também associado a Psoríase e Artrite Psoriásica em estudos chineses (LI et al., 2013; YANG et al., 2013). Anteriormente, foi testado em pacientes com Esclerose Múltipla em uma população hispânica, mas não foi encontrada associação com essa doença (LOPEZ DE LAPUENTE et al., 2012).

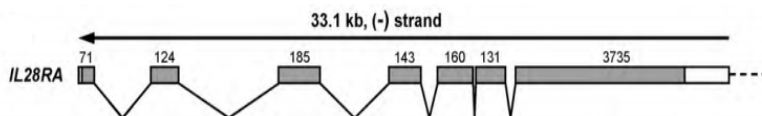
Não há na literatura estudos analisando a associação desse gene ou variante com outras DAs nem em outras populações. Dados esses, que são importantes para entender o papel dessa variante como um fator de risco para DAs em geral e /ou em outras etnias.

#### Figura 4 Localização do gene *IL28RA*



Fonte: (GENECARDS, 2018).

#### Figura 5 Estrutura do gene *IL28RA*



A imagem apresenta nos quadros destacados os 7 éxons do gene *IL28RA*.

Fonte: (WITTE et al., 2010)

## **2 JUSTIFICATIVA**

As doenças autoimunes possuem atualmente uma prevalência alta e, na maioria dos casos, são expressivamente debilitantes. Possuem uma etiologia complexa e apesar de inúmeros estudos até o momento, os mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento e a contribuição da predisposição genética ainda são pouco conhecidos. AR é uma DA bastante heterogênea com diversas manifestações clínicas, o que dificulta significativamente o diagnóstico e tratamento. Não há no momento bons marcadores para a doença ou tratamentos específicos eficientes. Uma possível associação de um gene para um receptor de citocinas altamente relevante no contexto da autoimunidade, já relacionado a outras DAs e em outras populações, com AR poderia contribuir para o conhecimento das vias envolvidas na doença e/ou manifestações clínicas, além de potencialmente contribuir para o desenvolvimento de marcadores genéticos e ferramentas terapêuticas mais específicas.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a variante SNP *rs4649203* do gene *IL28RA* em pacientes diagnosticados com AR e em indivíduos saudáveis (controles), em um estudo caso-controle de amostra populacional do estado de Santa Catarina.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Selecionar indivíduos sem indícios de DA e pacientes com AR do estado de Santa Catarina.
- Identificar a variabilidade do gene *IL28RA* em pacientes e indivíduos controles.
- Calcular as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo.
- Verificar se há associação entre os alelos e genótipos do SNP e a doença com suas principais manifestações clínicas.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo fez parte do projeto: “Genética da autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em pacientes de Santa Catarina”, aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC), nº 172/06. Todos os participantes desta pesquisa, tanto pacientes quanto controles, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir dos prontuários médicos, cujas informações clínicas datavam do dia da coleta e consulta. Todos os formulários se encontram nos anexos.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para esse estudo de caso-controle, selecionamos 176 amostras de pacientes com Artrite Reumatoide assistidos pelo Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago e 194 de controles voluntários sem nenhum indício de doença autoimune e sem histórico familiar, com idade e frequência de sexos semelhante. Ambos os grupos foram formados principalmente por indivíduos residentes do estado de Santa Catarina. As amostras selecionadas para a produção do trabalho foram disponibilizadas pelo Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE/UFSC) onde todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido **Anexo B**.

As manifestações clínicas utilizadas para análise foram retiradas do questionário respondido pelos pacientes que se encontra no **Anexo C** e dos prontuários médicos dos pacientes disponibilizados pelo hospital, ele apresentava as manifestações clínicas exteriorizadas. Foram analisados em nosso estudo os parâmetros: DAS28 (índice citado anteriormente), presença de sinovite (inflamação da membrana sinovial, principal manifestação da doença), nódulos reumatoides (nódulos subcutâneos, a manifestação extra-articular mais comum da AR), vasculite reumatoide (inflamação dos vasos sanguíneos), cardiopatia (qualquer alteração que acomete o coração), alterações na quantidade de leucócitos (leucopenia ou leucocitose), anemia (quantidade diminuída de eritrócitos e/ou da quantificação de hemoglobina), alterações na quantidade de plaquetas (trombocitopenia ou trombocitose), proteína C reativa (indicador de infecção ou inflamação), elevação da velocidade de hemossedimentação (VHS) (indicador de infecção ou inflamação), elevação das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) (ambos indicadores de

alterações hepáticas), além da sorologia para os anticorpos Anti-sm, Anti-CCP, Anti-Ana, Anti-HCV, Anti-RNP, Anti-Lúpico, Anti-Ro, Anti-LA, e o Fator Reumatoide (auto anticorpos presentes principalmente em DAs). Em adição, fatores como a presença de outras DAs nos pacientes ou familiares, idade de manifestação e sexo também foram avaliados.

#### 4.3 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração foi realizada anteriormente por integrantes do grupo do LAPOGE. Os métodos utilizados para realizar a extração do DNA foram o fenol clorofórmio e o “*salting out*”, protocolos padrão largamente descritos na literatura (OLIVEIRA et al., 2007).

#### 4.4 GENOTIPAGEM

A genotipagem das amostras foi realizada através de PCR quantitativa em tempo real a partir do DNA genômico. Essa técnica foi escolhida por sua precisão e maior confiança. Foram utilizadas sondas específicas *TaqMan®* (*Thermo Fisher Scientific*) para cada alelo. Na preparação das amostras foi adicionado 5 ng de DNA, água ionizada, sondas *TaqMan®*, *TaqMan® Genotyping Master Mix* o qual possui DNA polimerase, tampão, *rox™* e dNTPs (conforme o protocolo abaixo). O *mix* é adicionado a uma placa de 384 poços e selada com o adesivo *MicroAmp™ Optical Adhesive Film*. O método *TaqMan® Genotyping Assays*, é a técnica utilizada para genotipar os SNP através de um sistema com um par de iniciadores que flanqueia a região genômica que contém o polimorfismo, duas sondas marcadas com os fluoróforos VIC e FAM para detectar cada alelo do SNP escolhido (*rs4649203*) e o *Quencher*, um inibidor da fluorescência, que permite a emissão da mesma somente quando há ligação da sonda. A partir da emissão da fluorescência (VIC ou FAM, específicas para cada alelo), é possível analisar as curvas e identificar se o indivíduo é homozigoto (Figura 6) e para qual alelo, ou heterozigoto (figura 7). O processo que ocorre na qPCR pode ser observado na tabela X. A máquina utilizada para realizar a PCR quantitativa em tempo real foi a HT7900. Abaixo, podemos observar a sequência da sonda analisada e a localização do SNP *rs4649203* entre os colchetes apresentados na sequência abaixo.

**GCAAACGGCATAACCCACTGCTGG[A/G]TTGCAGAGGAG  
GAGTCCTTAGAGAT**

Primeiramente ocorre a desnaturação inicial da dupla fita de DNA e ativação da DNA polimerase com uma temperatura de 95°C por

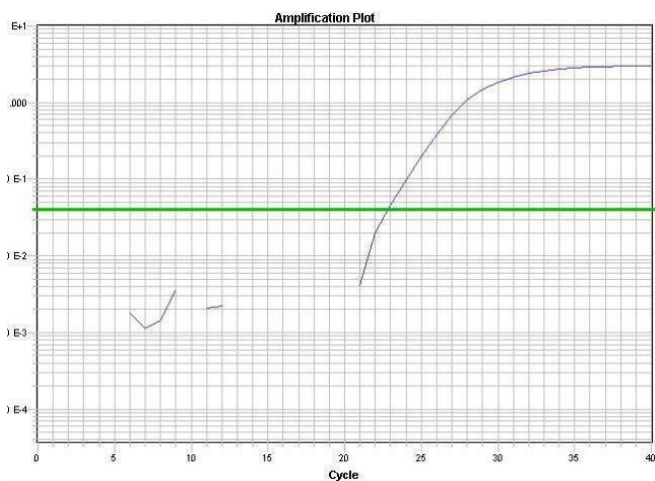


10 minutos, seguida de 40 ciclos de temperatura de 95°C por 15 segundos e uma temperatura de 60 °C por 1 minuto, permitindo que os *primers* realizem o *anelamento* na sequência específica e a DNA polimerase realiza a extensão da fita. Nessa última etapa, ela cliva a sonda hibridizada, liberando o inibidor de fluorescência e emitindo a fluorescência respectiva do alelo.

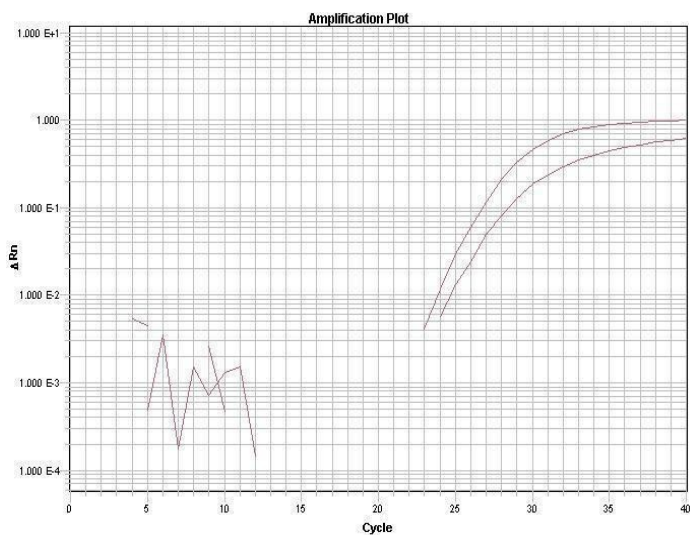
**Tabela 2 Processo de genotipagem por qPCR**

<i>AmpliTaq Gold</i>		95°C	
<i>Desnaturação</i>	ciclos	95°C	15 seg.
<i>Anelamento e extensão</i> (Dna polimerase)		60°C	1 min.

Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 6 Modelo de curva homozigota.**

Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 7 Modelo de curvas heterozigotas**

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.5 ESTATÍSTICA

Foram analisadas as frequências alélicas e genotípicas e calculado o valor da significância e *Odds Ratio*. Analisamos a associação alélica e todos os modelos de associação genotípicas para chegarmos aos resultados. Foram realizadas análises estatísticas para as principais manifestações clínicas que continham nos prontuários dos pacientes de AR, incluindo testes sorológicos para os auto anticorpos presentes.

**Tabela 3 Material para genotipagem de uma amostra**

Reagente	Composição	Quantidade	Concentração Final
	AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Ultra Pure (UP)		1 µm
TaqMan® Genotyping Master Mix (2X)	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs)		200 nM cada
	ROX™ Passive Reference Dye	2,50 µL	500 nM
	Tampão para enzimas (Buffer): Tris-HCl EDTA		10 nM 1 nM

SNP Genotyping Assays (40X)	TaqMan®	Iniciador senso	900 nM
		Iniciador antissenso	0,12 µL
			900 nM
		Sonda marcada com VIC	250 nM
		Sonda marcada com FAM	250 nM
	Água Milli-Q	1,38 µL	-
	Amostra de DNA	1 µL	5 ng
	Volume Total	5 µL	

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5. RESULTADOS

A **tabela 4** apresenta os dados das amostras dos pacientes, caracterizando o número de pessoas que possuíam as manifestações clínicas de acordo com os questionários preenchidos pelos próprios (o questionário consta no **Anexo C**).

**Tabela 4 Caracterização dos pacientes com AR**

<b>Características</b>	<b>n (%)</b>	
Homens	26	(14,77)
Mulheres	146	(82,95)
Sinovite	130	(73,86)
Nódulos Reumatoides	29	(16,48)
Vasculite Reumatoide	8	(4,55)
Cardiopatía	46	(26,14)
Anemia	36	(20,5)
Leucopenia	4	(2,3)
Leucocitose	10	(5,7)
Trombocitopenia	7	(4,0)
VHS Elevada	128	(72,2)
PCR Elevada	86	(48,9)
TGP	29	(16,5)
TGO	7	(3,97)
Anti-sm	25	(14,2)
Anti-CCP	88	(50,0)
Anti-Ana	116	(65,9)
Anti-HCV	48	(27,3)
Anti-RNP	98	(55,7)
Anti-Lúpico	16	(9,09)
Anti-Ro	40	(22,7)
Anti-LA	24	(13,6)
Fator Reumatoide	128	(72,7)
DAS 28	3,69 ± 0,92	

Idade de início da doença	43,15 ± 12,9	
Outras DAs	18	(10,2)
Outras DAs na família	14	(7,9)

Fonte: Elaborada pela autora.

As tabelas 5 e 6 trazem os dados das frequências alélicas e genotípicas de todos os pacientes e controles e também as frequências específicas dos indivíduos do sexo feminino e masculino separadamente. Não foi encontrada associação com a doença em si analisando todos os indivíduos ou nas amostras femininas. Considerando a frequência dos alelos em nossos pacientes e controles, conseguimos determinar o genótipo AA como genótipo de risco para AR somente nos pacientes masculinos (OR=11,66, Valor de  $p = 0,0219$ ). Na **tabela 7** podemos observar os autoanticorpos testados, sendo que não foi encontrada associação significativa com a presença de nenhum anticorpo.

**Tabela 5 Distribuição das frequências alélicas e genotípicas entre controles e pacientes com AR analisando todos os indivíduos**

Alelo	Casos (%)	Controles (%)	OR (CI)	Valor de $p$
A	144 (0,53)	163 (0,52)	0,97 (0,70 -1,34)	0,845
G	130 (0,47)	152 (0,48)	1	
Total	274	315		
Genótipos	Casos (%)	Controles (%)	OR (CI)	Valor de $p$
A/A	47 (0,27)	42 (0,22)	0,76 (0,47 -1,23)	0,270
A/G	97 (0,55)	121 (0,62)	0,95 (0,50 -1,81)	0,879
G/G	33 (0,22)	31 (0,16)	1,21 (0,70 -2,07)	0,498
Total	177	194		

OR: valor de *odd ratio*

Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 6 - Distribuição da frequência alélica e genotípica e testes de associação entre controles e pacientes com AR separados por gênero**

**Feminino**

Alelo	Casos (%)	Controles (%)	OR (CI)	Valor de <i>p</i>
A	116 (0,51)	126 (0,51)	1,03 (0,72-1,48)	0,866
G	113 (0,48)	119 (0,49)		
Total	229	245		
Genótipos	Casos (%)	Controles (%)	OR (CI)	Valor de <i>p</i>
A/A	33 (0,23)	34 (0,22)	1,02 (0,57-1,69)	0,937
A/G	83 (0,57)	92 (0,60)	1,14 (0,56-2,32)	0,708
G/G	30 (0,21)	27 (0,18)	1,21 (0,68-2,15)	0,524
Total	146	153		

**Masculino**

Alelo	Casos (%)	Controles (%)	OR (CI)	Valor de <i>p</i>
A	23 (0,66)	36 (0,53)	2,31 (0,98-5,43)	0,0543
G	12 (0,34)	32 (0,47)		
Total	35	68		
Genótipos	Casos (%)	Controles (%)	OR (CI)	Valor de <i>p</i>
A/A	14 (0,54)	8 (0,20)	11,66 (2,12-64,04)	0,0219
A/G	9 (0,35)	28 (0,70)	0,29 (0,10-0,83)	0,0047
G/G	3 (0,12)	4 (0,10)	0,098 (0,027-0,35)	0,0004
Total	26	40		

OR: valor de *odd ratio*

Fonte: Elaborada pela autora.

A **Tabela 8** traz a análise de associação da variante estratificada pelas principais características clínicas apresentadas pelos pacientes, citadas anteriormente. Não foi encontrado associação analisando apenas as frequências alélicas. Porém foi identificada uma associação genotípica de risco com o genótipo AA com três manifestações clínicas: a presença de vasculite reumatoide (OR = 4,76;  $p = 0,038$ ), a elevação da velocidade de hemossedimentação (OR = 2,99;  $p = 0,048$ ) e também para a elevação da proteína C reativa (OR = 2,44;  $p = 0,012$ ).



**Tabela 7 Associação com os autoanticorpos presentes nos pacientes com AR**

	MAF		OR (CI)	Valor de <i>p</i>	AA genótipo		Associação de modelo genotípico
Anti-sm	0,53	0,52	1,01 (0,50–2,05)	0,975	0,28	0,24	ns
Anti-CCP	0,54	0,50	1,17 (0,64–2,15)	0,603	0,28	0,23	ns
Anti-Ana	0,53	0,50	1,12 (0,50–2,48)	0,784	0,27	0,13	ns
Anti-HCV	0,51	0,54	0,89 (0,51–1,55)	0,680	0,17	0,30	ns
Anti-RNP	0,51	0,56	0,83 (0,44–1,57)	0,559	0,21	0,35	ns
Anti-lúpico	0,52	0,52	0,99 (0,43–2,29)	0,987	0,25	0,25	ns
Anti-Ro	0,58	0,50	1,36 (0,73–2,51)	0,330	0,40	0,18	ns
Anti-LA	0,53	0,52	1,01 (0,50–2,02)	0,979	0,25	0,25	ns
Fator Reumatoide	0,53	0,52	1,01 (0,57–1,80)	0,963	0,27	0,28	ns

MAF significa *minor allele frequency*. NS: *non significant*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 Associação com as manifestações de AR

	MAF		OR (CI)	Valor de p	AA genótipo		Associação de modelo genotípico	OR (CI)	Valor de p
Manifestações	+	-			+	-			
Sinovite	0,44	0,54	0,68 (0,39-1,18)	0,169	0,28	0,26	ns		
Nódulos Reumatoides	0,59	0,52	1,33 (0,70-2,54)	0,385	0,34	0,26	ns		
Vasculite Reumatoide	0,70	0,52	2,14 (0,54-8,45)	0,278	0,63	0,26	Dominante	4,76 (1,09-20,79)	0,038
Cardiopatia	0,52	0,53	0,93 (0,53-1,62)	0,794	0,29	0,27	ns		
Anemia	0,55	0,52	1,11 (0,60-2,03)	0,740	0,33	0,26	ns		
Leucopenia	0,60	0,53	1,34 (0,22-8,18)	0,748	0,50	0,27	ns		
Leucocitose	0,57	0,53	1,20 (0,40-3,56)	0,743	0,40	0,27	ns		
Trombocitopenia	0,5	0,53	0,89 (0,22-3,62)	0,866	0,43	0,27	ns		
VHS Elevado	0,55	0,47	1,37 (0,79-2,39)	0,262	0,32	0,16	Dominante	2,99 (1,01-8,86)	0,047
PCR Elevada	0,56	0,50	1,28 (0,78-2,09)	0,326	0,36	0,19	Dominante	2,44 (1,21-4,92)	0,012
TGP	0,51	0,53	0,91 (0,49-1,68)	0,756	0,14	0,31	ns		
TGO	0,63	0,57	0,80 (0,18-3,54)	0,777	0,40	0,14	ns		
DAS28<2,6	0,53	0,50	0,88 (0,33-2,33)	0,812	0,27	0,31			

VHS: Velocidade de hemossedimentação; PCR: Proteína C reativa;  
DAS28: Disease Activity score; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

As citocinas são importantes fatores secretados pelas células do sistema imune e estão relacionadas tanto com a imunidade inata quanto com a adaptativa. Suas funções estão relacionadas com a ativação de funções efetoras dos linfócitos e fagócitos e o movimento direcionado de células imunes do sangue para os tecidos (ABBAS; LICHTMAN, 2009). São proteínas que medeiam diversas respostas celulares, como ativação, inibição, diferenciação e crescimento. Existem em grande variedade e atuam no organismo de forma autócrina, parácrina ou endócrina, exercendo suas funções ligando-se a receptores específicos presentes na superfície das células (DE OLIVEIRA et al., 2011). O gene *IL28RA* codifica uma proteína que forma um complexo receptor de citocinas heterodímero quando juntado ao *IL10R2* (AKHTAR et al., 2016).

Assim, alterações nesse gene já foram relatadas em diversas situações patológicas. Um outro SNPs do gene *IL28RA* (rs10903035) foi descrito como fator de risco independente para a falha do tratamento com IFN- $\alpha$  contra o vírus da hepatite C (HCV). Ele também foi associado com resistência à insulina em pacientes infectados por HIV e HCV (JIMÉNEZ-SOUSA et al., 2013).

A expressão do RNA mensageiro de *IL28RA* está aumentada em pacientes com LES em relação a indivíduos controle, e relacionado ao estado de atividade da doença, o que sugere um envolvimento do *IL28RA* na doença. Entretanto, não foi encontrada nesse estudo relação entre os níveis de expressão de *IL28RA* e a variante *rs4649203* (CHENG et al., 2015).

O mapeamento do gene *IL28RA* revelou que o *rs4649203* está localizado na região não traduzida (3'-UTR) do gene. Polimorfismos neste domínio podem interferir na expressão gênica de forma aumentada ou diminuída (KOTENKO et al., 2003).

Além da expressão o gene e essa variante especificamente foram anteriormente associados geneticamente ao desenvolvimento de LES e psoríase em estudos GWAS e caso-controle em populações chinesas com o alelo G considerado como de risco e europeia com o alelo A considerado como de risco (LI et al., 2013; STRANGE et al., 2010). Analisando todos os indivíduos não foi observada associação com a doença em si, porém estratificando por gênero pudemos observar uma significativa correlação da doença com o genótipo *rs4649203-AA*. O que pode indicar que o esse genótipo pode ser considerado como um fator de risco para pacientes do sexo masculino.

O fato de uma variante se mostrar de risco para uma doença como de risco para umas doenças e protetivo para outras não é incomum, considerando que o mesmo fator ou gene pode estar em uma via relevante ao grupo de doenças, porém diferentes alterações podem levar a suscetibilidade a diferentes doenças específicas. Também não é incomum uma variante estar associada a um fenótipo somente em um dos sexos. Outros trabalhos encontrados consideraram o alelo A como de risco para o desenvolvimento da doença em

No caso da AR, como dito anteriormente, esta apresenta um viés sexual onde as mulheres são mais suscetíveis do que homens a desenvolver a doença. Fato esse provavelmente relacionado a fatores hormonais. Assim, estudos sugerem que quando comparados com mulheres, homens necessitam de mais fatores genéticos de risco para manifestação da doença (SOKKA et al., 2009). Eles também tendem a desenvolver a doença em idade mais tardia e apresentam normalmente manifestações consideradas mais graves como maior produção de autoanticorpos e manifestações extra articulares. Assim, outros estudos já relataram associações genéticas que se relacionam somente a um dos sexos (GEROSA et al., 2008; MIKULS et al., 2011). Entretanto, também temos que ressaltar que no presente estudo o número amostral de pacientes do gênero masculino é baixo, e assim há de se considerar que a associação encontrada também pode ter ocorrido ao acaso e deve ser vista com cautela e ser ulteriormente investigada para ser corroborada ou não.

Analizando os dados clínicos dos pacientes também pudemos identificar uma associação de risco do genótipo AA com relação a valores elevados da Proteína C reativa, com o aumento da Velocidade de Hemossedimentação e também com a presença de vasculite reumatoide.

Vasculite reumatoide é considerada uma complicação rara e uma das manifestações extra articulares mais letais que ocorre em pacientes com AR (MAKOL; MATTESON; WARRINGTON, 2015). A causa clínica é desconhecida e se caracteriza por inflamação dos vasos sanguíneos. Seu desenvolvimento está ligado a pacientes que possuem altos níveis de fator reumatoide e normalmente está relacionada a AR de longa data e deformidades articulares severas, podendo assim ser considerada uma característica de uma forma mais grave da doença (COJOCARU; COJOCARU; CHICOŞ, 2015). Entretanto, assim como a associação com pacientes masculinos, o número de pacientes com essa manifestação é baixo e assim essa correlação também requer cautela.

A proteína C reativa (PCR) é um marcador inespecífico de infecção e/ou inflamação. Sua concentração tende a sofrer alterações

significativas em diversos estados inflamatórios. Assim, no contexto da AR é usada para estimar o grau de inflamação e é um dos parâmetros utilizados para o diagnóstico e para avaliar a atividade e como monitoramento da doença (SILVA; PAIS; LACERDA, 2012). Diversas citocinas influenciam a síntese de proteínas como PCR pelos hepatócitos, e suas concentrações variam conforme a doença se agrava ou ameniza (AGUIAR et al., 2013). Pacientes que apresentam altos índices de PCR tendem a ter um risco aumentado para degradação óssea e necessitam de um cuidado maior em estratégias de tratamentos (SHERVINGTON et al., 2018). É possível relacionar que as pessoas com Vasculite reumatoide, tenham uma elevação da PCR e dessa forma, a associação encontrada aqui com essas duas manifestações como fator de risco, se torna bastante coerente.

Outra manifestação que encontramos associação com a variante testada foi à velocidade de hemossedimentação (VHS). Esse parâmetro avalia a velocidade com que os eritrócitos se sedimentam no plasma e também representa um marcador indireto e inespecífico de inflamação. Existem inúmeras condições que influenciam no aumento da VHS, como alterações nos componentes do plasma como o fibrinogênio, as imunoglobulinas e outras proteínas de reação de fase aguda (COLLARES; VIDIGAL, 2004), desta forma, ela não representa um biomarcador específico de nenhuma doença, porém é um indicador do grau de inflamação e atividade da doença (RAASCHOU et al., 2013). Também está presente normalmente com vasculite reumatoide e valores elevados da PCR.

Nossos resultados sugerem que o genótipo AA está associado a um perfil de risco quanto a vários parâmetros inflamatórios e que podem ser considerados como medidas da atividade da doença. Assim, estariam relacionados a uma forma mais severa da doença.

Importante ressaltar que os parâmetros da PCR e VHS não são específicos de AR, estão normalmente alterados em outras DAS inflamatórias também (AGUIAR et al., 2013; SANTOS; CUNHA; CUNHA, 2000).

Os estudos anteriores que investigaram essa variante não analisaram as manifestações clínicas da doença, assim não podemos comparar nossos resultados encontrados com a literatura. Atualmente o estudo genético em desordens complexas vêm dissecando cada vez mais os sub-fenótipos das desordens. No caso da AR sabe-se que a evolução é muito variável. Alguns pacientes apresentam apenas um processo de curta duração oligoarticular com lesões controladas e sutis, enquanto outros sofrem uma poliartrite severa e progressiva e evoluem com

acometimento de vários órgãos e sistemas, como pele, coração, pulmões, músculos e vasos sanguíneos. Através de estudos mais minuciosos pode-se identificar fatores de risco tanto para a doença de forma geral quanto para características clínicas particulares envolvidas, auxiliando na estimativa do prognóstico da doença para cada paciente.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que apresenta uma associação deste polimorfismo e AR. Nossos resultados são sugestivos, mas podem ser ampliados em estudos posteriores e contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na via de citocinas no desenvolvimento da AR, assim como em outras DAs. Novos estudos podem ajudar a esclarecer o potencial impacto dessa variante genética na susceptibilidade individual a vias patológicas específicas. Esse entendimento é essencial para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais apuradas e medicamentos mais individualizados no futuro, onde o fenótipo muito amplo “Artrite Reumatoide” está longe do ideal e variantes genéticas individuais podem ser consideradas na caracterização de manifestações clínicas particulares, no prognóstico e tratamento de maneira mais específica.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o SNP *rs4649203* no gene *IL28RA* está associado geneticamente ao desenvolvimento de AR. Essa associação do genótipo AA com a doença como fator de risco pode ser observada somente em indivíduos masculinos. A variante também se mostrou correlacionada à presença de algumas manifestações clínicas particulares da AR: a presença de vasculite reumatoide, uma grave complicação da doença, e com níveis aumentados da PCR e a VHS, importantes biomarcadores inflamatórios. Este trabalho foi o primeiro a testar e identificar uma associação desse polimorfismo com AR e os dados podem ser fatores importantes para estudos avançados em AR.





## 7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico*. Elsevier, 2009.
- AGUIAR, F. J. B. et al. Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 2013.
- AKHTAR, H. et al. Unraveling the molecular mechanism governing the tissue specific expression of IFN $\lambda$ R1. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3, p. 795–799, 2016.
- ALILA MEDICAL MEDIA. **Artrite reumatóide da mão**. Disponível em: <<https://www.alilamedicalmedia.com/pt/-/galleries/images-only/bones-joints-and-muscles-images/-/medias/f7733ee0-0914-11e3-a642-819de9a65094-artrite-reumatoide-da-mao>>.
- ALTMAN, R. D. *Artrite Reumatoide (AR)*. p. 1–9, 2018.
- AN, Q. et al. Enhanced neutrophil autophagy and increased concentrations of IL-6, IL-8, IL-10 and MCP-1 in rheumatoid arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 65, p. 119–128, 1 dez. 2018.
- ANDERSSON, A. K.; LI, C.; BRENNAN, F. M. **Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis**. *Arthritis Research and Therapy*, 2008.
- ASSIS, M. R. DE; SERAFIM, P. A. A artrite reumatoide e a síndrome metabólica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2016.
- ATAÍDE, L. DE N. Manifestações extra-articulares da artrite reumatoide. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 10, n. 3, p. 74–83, 2009.
- BROWN, A. K. et al. Presence of significant synovitis in rheumatoid arthritis patients with disease-modifying antirheumatic drug-induced clinical remission: Evidence from an imaging study may explain structural progression. **Arthritis and Rheumatism**, 2006.
- CASTRO-SANTOSA, P.; DÍAZ-PENÁ, R. Genética da artrite reumatoide: É necessário um novo impulso em populações latino-americanas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2016.
- CHAE, S. C. et al. Analysis of the variations in IL-28RA gene and their association with allergic rhinitis. **Experimental and Molecular Medicine**, 2006.
- CHENG, Y.-Y. et al. Increased expression of IL-28RA mRNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 34, n. 10, p. 1807–1811, 2015.
- COJOCARU, M.; COJOCARU, I. M.; CHICOŞ, B. New insight into the rheumatoid vasculitis. **Romanian Journal Of Internal Medicine**, v. 53, n. 2, p. 1–5, 2015.
- COLLARES, G. B.; VIDIGAL, P. G. Recomendações para o uso da velocidade de hemossedimentação. v. 14, n. 31, 2004.
- DE OLIVEIRA, C. M. B. et al. **Citocinas e Dor**. *Revista Brasileira de*

**Anestesiologia**, 2011.

ERCOLINI, A. M.; MILLER, S. D. The role of infections in autoimmune disease. **B**, 2009.

FIRESTEIN, G. S. The disease formerly known as rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 3, p. 114, 2014.

GENECARDS. IFNLR1 Gene Interferon Lambda Receptor 1. 2018.

GEORGANAS, C. et al. Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 12, p. 7199–206, 2000.

GEROSA, M. et al. **Rheumatoid arthritis: A female challenge. Women's Health**, 2008.

GOELDNER, I.; SKARE, T. L.; REASON, I. T. D. M. Artrite reumatoide : uma visão atual. **J Bras Patol Med Lab**, 2011.

GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. **Genetics of autoimmune diseases - Disorders of immune homeostasis. Nature Reviews Genetics**, 2006.

HAMPE, C. S. B Cells in Autoimmune Diseases. **Scientifica**, 2012.

JIMÉNEZ-SOUSA, M. A. et al. IL28RA polymorphism is associated with early hepatitis C virus (HCV) treatment failure in human immunodeficiency virus-/HCV-coinfected patients. **Journal of Viral Hepatitis**, 2013.

KOTENKO, S. V. et al. **IFN-λs mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. Nature Immunology**, 2003.

LAURINDO, I. M. M. et al. Artrite reumatóide: Diagnóstico e Tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2004.

LI, Y. et al. Association analyses identifying two common susceptibility loci shared by psoriasis and systemic lupus erythematosus in the Chinese Han population. **Journal of Medical Genetics**, 2013.

LING, Y.; PUEL, A. **IL-17 and infections. Actas Dermo-Sifiliograficas**, 2014.

LOPEZ DE LAPUENTE, A. et al. Analysis of the IL28RA locus as genetic risk factor for multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, 2012.

LORENZI, J. C. C.; LORENZI, V. C. B.; ZANETTE, D. L. LINFÓCITOS T CD4+ E A RESPOSTA IMUNE. **Scire Salutis, Aquidabã**, v. 2, n. 1, p. 5–9, 2012.

LOUZADA, P. et al. Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no estado de São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2007.

MACHADO, P. R. L. et al. **Mecanismos de resposta imune às infecções** **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2004.

MAKOL, A.; MATTESON, E. L.; WARRINGTON, K. J. **Rheumatoid vasculitis: An update** **Current Opinion in Rheumatology**, 2015.

MANGINI, C.; DE MELO, F. A. F. Artrite reumatóide, terapia imunossupressora e tuberculose. **Revista Brasileira de Reumatologia**,

2003.

MARQUES, C. E. V. DE C. M. C. **Doenças Autoimunes do Sistema Nervoso**. [s.l.] Universidade de Lisboa, 2011.

MEDEIROS, M. M. DAS C. et al. Correlation of rheumatoid arthritis activity indexes (Disease Activity Score 28 measured with ESR and CRP, Simplified Disease Activity Index and Clinical Disease Activity Index) and agreement of disease activity states with various cut-off points in a Nor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2015.

MESCOUTO MELO, K.; TAVARES COSTA CARVALHO, B. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, 2009.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol**, 2010.

MIKULS, T. R. et al. Associations of disease activity and treatments with mortality in men with rheumatoid arthritis: Results from the VARA registry. **Rheumatology**, 2011.

MORI, C. F. G.; LIMA, G. L. Elementos básicos da auto-imunidade em Reumatologia. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 4, p. 123–127, 2008.

MOTA, L. M. H. DA et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2011.

MOTA, L. M. H. DA; LAURINDO, I. M. M.; SANTOS NETO, L. L. DOS. **Artrite reumatoide inicial: conceitos** **Revista da Associação Médica Brasileira**, 2010.

NCBI. **IFNLR1 interferon lambda receptor 1 [ Homo sapiens (human) ]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/163702>>.

OLIVEIRA, M. C. D. S.; REGITANO, L. C. D. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATOCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Embrapa Pecuária Sudeste, [s. l.], p. 43, 2007. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>>

PROJETADO POR BRGFX - FREEPIK.COM. **Diagrama que mostra a artrite reumatóide em uma mão**.

RAASCHOU, P. et al. Rheumatoid arthritis, anti-tumour necrosis factor therapy, and risk of malignant melanoma: nationwide population based prospective cohort study from Sweden. **Bmj**, 2013.

REGO, C. M. Artrite Reumatóide Fisiopatologia e Terapêutica biológica. 2010.

- SANTOS, V. M. DOS; CUNHA, S. F. D. C. DA; CUNHA, D. F. DA. Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações Método: princípios e fatores envolvidos. **Rev Ass Med Brasil**, 2000.
- SCODELER, G. C.; REZENDE, F. C. B. E. Avanços e perspectivas dos estudos da artrite reumatoide Advances and prospects of studies of rheumatoid arthritis Avances y perspectivas de los estudios de la artritis reumatoide. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, p. 386–391, 2016.
- SHEPPARD, P. et al. **IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R** *Nature Immunology*, 2003.
- SHERVINGTON, L. et al. Identifying Reliable Diagnostic/Predictive Biomarkers for Rheumatoid Arthritis. **Biomarker Insights**, v. 13, p. 117727191880100, 2018.
- SILVA, D.; PAIS, A.; LACERDA, D. Proteína C reativa de alta sensibilidade como biomarcador de , a coronária. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 31, n. 11, p. 733–745, 2012.
- SOKKA, T. et al. Women, men, and rheumatoid arthritis: Analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA Study. **Arthritis Research and Therapy**, 2009.
- SOUZA, A. W. S. DE et al. Sistema imunitário: parte II . O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.
- STRANGE, A. et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. **Nature Genetics**, 2010.
- TOBÓN, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, 2010.
- VANDENBROECK, K. Cytokine Gene Polymorphisms and Human Autoimmune Disease in the Era of Genome-Wide Association Studies. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, 2012.
- WASTOWSKI, I. J.; CARVALHO, I. F. DE; DONADI, E. A. Patogenia das Doenças Auto-imunes. v. Capítulo 3, n. September 2017, p. 43–56, 2009.
- WHO. **Chronic rheumatic conditions**.
- WITTE, K. et al. **IL-28A, IL-28B, and IL-29: Promising cytokines with type I interferon-like properties** *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2010.
- YANG, Q. et al. Investigation of 20 non-HLA (human leucocyte antigen) psoriasis susceptibility loci in Chinese patients with psoriatic arthritis and psoriasis vulgaris. **British Journal of Dermatology**, 2013.
- ZHANG, Y. et al. Expression of leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) on osteoclasts and its potential role in rheumatoid arthritis. **Clinics**, 2013.

## ANEXO A - Termo de esclarecimento

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR,  
EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### AO PACIENTE

Projeto de Pesquisa: “GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE:  
POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E  
ARTRITE REUMATÓIDE EM PACIENTES DE SANTA  
CATARINA”.

Informações: Este estudo tem como objetivo investigar aspectos genéticos e da saúde de controles saudáveis e de pacientes que desenvolveram Artrite Reumatoide. Para isso pedimos sua colaboração e permissão para doação de 10 ml de sangue periférico, que contém o DNA (molécula que contém os genes, que carregam as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de medicamentos e de substâncias estranhas ao organismo e, também, relacionados à resposta imunológica), e o aparecimento desta doença. O DNA extraído das amostras coletadas será armazenado no Laboratório, sob responsabilidade da coordenadora do projeto. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que sua participação é voluntária, não influenciando no seu atendimento e tratamento. As informações aqui coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos sob sigilo e serão utilizados somente

pela equipe interna que faz parte desta pesquisa. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721- 9804 e conversar com a Profa. Dra. Iliada Rainha de Souza ou com 129 o Prof. Dr. Ivânio Alves Pereira (no ambulatório de Reumatologia, telefone: 3721-9133). Procedimentos: Caso concorde em participar, você irá responder a um questionário com duração aproximada de 5 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram doença autoimune, como artrite reumatoide ou outra doença reumática, etc. Riscos: A coleta de sangue é um procedimento normal durante o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer, não representando maiores preocupações. Custos: Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo Benefícios Você não terá nenhum benefício direto logo após participar desta pesquisa, no entanto, os resultados deste estudo poderão permitir, num futuro próximo, um tratamento mais eficaz. Num futuro posterior, poderá permitir novas alternativas para prevenção da doença e identificação de pessoas que possuem risco em desenvolver a doença.

Assinaturas:

Pesquisador auxiliar \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu,

\_\_\_\_\_, fui  
esclarecido(a) sobre a pesquisa “GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE:  
POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E  
ARTRITE REUMATOIDE EM PACIENTES DE SANTA  
CATARINA”, e concordo que meus dados sejam utilizados na  
realização da mesma. Florianópolis,

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG:

\_\_\_\_\_

## ANEXO C - Questionário aplicado nos pacientes com ar

Universidade Federal de Santa Catarina

Departamento de Biologia Molecular, Embriologia e Genética/CCB

Departamento de Clínica Médica/CCS

Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Artrite Reumatoide

NOME \_\_\_\_\_ Prontuário/HU \_\_\_\_\_  
 IDADE: \_\_\_\_\_ anos SEXO: ( ) F ( ) M COR da Pele: \_\_\_\_\_  
 Procedência: \_\_\_\_\_ Natural de: \_\_\_\_\_  
 Estado Civil: S C D V Ocupação: \_\_\_\_\_  
 Telefone:( ) \_\_\_\_\_ Celular:( ) \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_  
 Data de nascimento: \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_  
 DATA da coleta: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ AR: \_\_\_\_\_  
 Médico: \_\_\_\_\_  
 Entrevistador: \_\_\_\_\_  
 DADOS Familiares:  
 NOME do pai: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_  
 Ascendência Materna \_\_\_\_\_  
 Paterna \_\_\_\_\_  
 NOME da mãe: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_  
 Profissão: \_\_\_\_\_  
 Ascendência Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_  
 Tempo de doença diagnosticada: \_\_\_\_\_

Histórico Familiar: AR S N Parentesco: \_\_\_\_\_  
 Outras D. Reumat. ( ) S ( ) N Parentesco: \_\_\_\_\_  
 Manifestações Iniciais: ( ) Febre Rigidez Matinal

Articulações acometidas Derrame Articular Dor Articular  
 Ombro Cotovelo Punho MCF IFPM Quadril Joelho  
 ( ) Tornozelo ( ) MTF ( ) IFPP Outras \_\_\_\_\_  
 Manifestações Extra articulares: Pleurite Pericardite Vasculite  
 Reumatoide Nódulos Reumatoides Acometimento Ocular  
 Acometimento Pulmonar Acometimento Renal Amiloidose



Outras \_\_\_\_\_

Evolução: Interações: ( ) S ( ) N Informações \_\_\_\_\_

Observações: ( ) Osteoporose? ( ) Diabetes? ( ) Depressão?

Sintomatologia Recente:

(Nos últimos 10 dias)

( ) Febre Rigidez Matinal ( ) Derrame Articular ( ) Dor Articular  
Articulações acometidas

( ) Ombro ( ) Cotovelo ( ) Punho ( ) MCF ( ) IFPM ( ) Quadril

( ) Joelho ( ) Tornozelo ( ) MTF ( ) IFPP Outras \_\_\_\_\_

Manifestações Extra-articulares:

( ) Pleurite ( ) Pericardite ( ) Vasculite Reumatoide ( ) Nódulos  
Reumatoides

( ) Acometimento Ocular ( ) Acometimento Pulmonar

( ) Acometimento Renal ( ) Amiloidose

Outras \_\_\_\_\_

( ) Envolvimento Cardiovascular:

( ) HAS ( ) Doença Coronariana ( ) Angina ( ) IAM Prévio

( ) Envolvimento Neurológico:

( ) Revascularização do Miocárdio ( ) Cateterismo Prévio ( ) AVC

( ) AIT

( ) Ateroma em Carótidas

( ) Dislipidemia:

( ) Hipercolesterolemia ( ) Hipertrigliceridemia

Hist. Familiar de Doença Cardiovascular:

( ) S ( ) N Parentesco \_\_\_\_\_

Tratamento Atual:

Corticosteroide: ( ) S ( ) N \_\_\_\_\_ Dose \_\_\_\_\_

Frequência \_\_\_\_\_ Metotrexato: ( ) S ( ) N Dose \_\_\_\_\_

Frequência \_\_\_\_\_

Sulfasalazina: ( ) S ( ) N Dose \_\_\_\_\_ Frequência \_\_\_\_\_

Antimalárico: ( ) S ( ) N Dose \_\_\_\_\_ Frequência \_\_\_\_\_

Ciclofosfamida: ( ) S ( ) N Dose \_\_\_\_\_ Frequência \_\_\_\_\_

Infliximab: ( ) S ( ) N Dose \_\_\_\_\_ Frequência \_\_\_\_\_

ETANERcept: ( )S ( )N Dose\_\_\_\_ Frequência\_\_\_\_  
 AINE: ( )S ( )N Dose\_\_\_\_ Frequência\_\_\_\_  
 Analgésicos: ( )S ( )N Dose\_\_\_\_ Frequência\_\_\_\_  
 Outros ( )S ( )N Dose\_\_\_\_ Frequência\_\_\_\_  
 Idade da Menarca: \_\_\_\_anos Menopausa: ( ) S ( ) N Idade\_\_\_\_  
 Histerectomia ( )S ( )N Idade\_\_\_\_ Ovariectomia ( )S ( )N  
 Idade\_\_\_\_  
 Fase do Ciclo Reprodutivo ( ) Menacme ( ) Climatério  
 Gestações\_\_\_\_ Paridade\_\_\_\_  
 ( )Abortos? ( ) Induzido ( )Espontâneo  
 Tratamento Hormonal  
 Antes do Diagnóstico: ( )S ( )N Qual? AC Outro\_\_\_\_  
 Duração:\_\_\_\_ Parou há quanto tempo:\_\_\_\_  
 Tratamento Medicamentoso Antes do Diagnóstico: ( )S ( )N  
 Qual?\_\_\_\_ História de Uso de DROGAS:  
 Álcool: ( )S ( )N Qual?\_\_\_\_ Quantidade:\_\_\_\_  
 Frequência:\_\_\_\_  
 Cigarro: ( )S ( )N Cigarros/dia\_\_\_\_  
 Se fumava, qual a duração?\_\_\_\_ Quando parou?\_\_\_\_  
 Algum familiar ou amigo próximo é fumante? ( )S ( )N  
 \_\_\_\_\_  
 Drogas Ilícitas: ( )S ( )N Qual?\_\_\_\_  
 Por quanto tempo?\_\_\_\_

## ANEXO D - Questionário para medir a gravidade da doença nos pacientes

### Health Assesment Questionnaire (HAQ)

Nível de dificuldade

Você é capaz de: Sem qualquer Com alguma Com muita Incapaz

0 1 2 3

1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões do sapato e abotoar suas roupas?

0 1 2 3

2. Lavar sua cabeça e seus cabelos?

0 1 2 3

3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braço?

0 1 2 3

4. Deitar-se e levantar-se da cama

0 1 2 3

5. Cortar um pedaço de carne?

0 1 2 3

6. Levar à boca um copo ou uma xícara cheia de café ou água?

0 1 2 3

7. Abrir um saco de leite comum?

0 1 2 3

8. Caminhar em lugares planos?

0 1 2 3

9. Subir 5 degraus?

0 1 2 3

10. Lavar e secar seu corpo após o banho?

0 1 2 3

11. Tomar banho de chuveiro?

0 1 2 3

12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?

0 1 2 3

13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 kg que está posicionado pouco acima de sua cabeça?

0 1 2 3

14. Curvar-se para pegar suas roupas chão?

0 1 2 3

15. Segurar-se em pé no ônibus ou no metrô?

0 1 2 3

16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido abertos previamente?

0 1 2 3

17. Abrir e fechar torneiras?

0 1 2 3

18. Fazer compras nas redondezas onde mora?

0 1 2 3

19. Entrar e sair de um ônibus?

0 1 2 3

20. Realizar tarefas tais como usar a vassoura para varrer e rodo para água?

0 1 2 3

Escore dos Componentes:

Componente 1 perguntas 1 e 2: \_\_\_\_\_ Maior escore: \_\_\_\_\_

Componente 2 perguntas 3 e 4: \_\_\_\_\_ Maior escore: \_\_\_\_\_

Componente 3 perguntas 5, 6 e 7: \_\_\_\_\_ Maior escore: \_\_\_\_\_

Componente 4 perguntas 8 e 9: \_\_\_\_\_ Maior escore: \_\_\_\_\_

Componente 5 perguntas 10, 11 e 12: \_\_\_\_\_ Maior escore: \_\_\_\_\_

Componente 6 perguntas 13 e 14: \_\_\_\_\_ Maior escore: \_\_\_\_\_

Componente 7 perguntas 15 e 16: \_\_\_\_\_ Maior escore: \_\_\_\_\_

Componente 8 perguntas 18, 19 e 20: \_\_\_\_\_ Maior escore: \_\_\_\_\_

## **ANEXO E - Questionário de identificação do grupo controle**

Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Biológicas Departamento de Biologia Celular,  
Embriologia e Genética – BEG Laboratório de Polimorfismos Genéticos

### **QUESTIONÁRIO – GRUPO CONTROLE IDENTIFICAÇÃO**

Data: \_\_/\_\_/\_\_ Coleta: ( ) sangue

Dados Pessoais:

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone Residencial: \_\_\_\_\_

Telefone Trabalho: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) M ( ) F Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Estado Civil:

\_\_\_\_\_ Tipo de sangue: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Aposentado: ( ) Sim ( ) Não

Escolaridade: ( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto ( ) 1º grau completo  
( ) 2º grau incompleto ( ) 2º grau completo ( ) superior incompleto ( )  
superior completo ( ) pós graduação

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Ascendência:

Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Etnia: ( ) Euro descendente ( ) Afro descendente ( ) Asiático  
descendente ( ) Indígena

Cor da pele: ( ) negra ( ) mulata ( ) amarela ( ) branca

Observação:

\_\_\_\_\_ Dados Familiares:

Nome do pai:

\_\_\_\_\_ Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Ascendência do pai:

Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Descendência da mãe:

Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Possui Irmãos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

Possui filhos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? ( ) Sim ( ) Não

Frequência: ( ) Todos os dias ( ) Fim de semana ( ) Esporadicamente

(Festas) Quantidade (copos 200ml): \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

( ) Cerveja ( ) Vinho ( ) Cachaça ( ) Outro \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

( ) Cerveja ( ) Vinho ( ) Cachaça ( ) Outro \_\_\_\_\_

Pratica Exercícios Físicos? ( ) Sim ( ) Não Tipo: \_\_\_\_\_

Quantidade: ( ) menos de

30 min ( ) 30 min ( ) 1h ( ) mais de 1 h

Frequência: ( ) 1x semana ( ) 2-3x semana ( ) 4-6x semana ( ) Todo os

dias ( ) Menos de 1x semana

Você Fuma? ( ) Sim ( ) Não

Você já Fumou? ( ) Sim ( ) Não Tipo: ( ) Cigarro ( ) Charuto ( )

Cachimbo

( ) Outro \_\_\_\_\_ Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia) \_\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_ Data da entrevista: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Identificação: \_\_\_\_\_

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: \_\_\_\_\_

MENOPAUSA: ( ) Sim ( ) Não Idade: \_\_\_\_\_

HISTERECTOMIA: ( ) Sim ( ) Não

PARIDADE:

Nº de gestações \_\_\_\_\_ Idade da 1ª gestação \_\_\_\_\_

Nº de filhos ( ) nulípara N: \_\_\_\_\_

Abortos ( ) P ( ) E N: \_\_\_\_\_

Amamentou: ( ) Sim ( ) Não Tempo total (meses): \_\_\_\_\_

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? ( ) Sim ( ) Não Já utilizou AC? ( ) Sim ( ) Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: \_\_\_\_\_

Tempo que usa ou usou AC: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo parou?

\_\_\_\_\_

Faz TRH? ( ) Sim ( ) Não Já fez TRH? ( ) Sim ( ) Não Nome do Hormônio: \_\_\_\_\_

Tempo que faz ou fez TRH: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

( ) Outros hormônios \_\_\_\_\_ Tempo total: \_\_\_\_\_

Observações

Histórico Médico

Caso de CÂNCER pessoal? ( ) Sim ( ) Não Tipo: \_\_\_\_\_

Casos de CÂNCER DE MAMA na família? ( ) Sim ( ) Não

Grau de Parentesco: ( ) filha ( ) irmã ( ) mãe ( ) avó ( ) tia materna 1º grau ( ) tia paterna 1º grau ( ) prima materna 1º grau ( ) prima paterna 1º grau ( ) Outros \_\_\_\_\_

Casos de CÂNCER de outro tipo na família? ( ) Sim ( ) Não

Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_

Caso de TUMOR BENIGNO pessoal? ( ) Sim ( ) Não

Local: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Caso de DOENÇA AUTOIMUNE pessoal? (

) Sim ( ) Não

Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Tempo de diagnóstico: \_\_\_\_\_

Casos de DOENÇA AUTOIMUNE na família? ( ) Sim ( ) Não Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_ Você tem alguma DOENÇA

CARDIOVASCULAR?: ( ) Sim ( ) Não Qual?(s) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ HIPERTENSÃO ARTERIAL: ( ) Sim ( ) Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: ( ) Sim ( ) Não

OSTEOPOROSE: ( ) Sim ( ) Não

DOENÇA REUMÁTICA: ( ) Sim ( ) Não

DIABETES: ( ) Sim ( ) Não

ASMA: ( ) Sim ( ) Não

HIV: ( ) Sim ( ) Não ( ) Nunca fez exame

HEPATITE: ( ) Sim ( ) Não ( ) Nunca fez exame

DENGUE: ( ) Sim ( ) Não

TUBERCULOSE: ( ) Sim ( ) Não

DISTÚRPIO RENAL: ( ) Sim ( ) Não

DISTÚRPIO PULMONAR: ( ) Sim ( ) Não

DISTÚRPIO HEPÁTICO: ( ) Sim ( ) Não

Casos de DOENÇA DE ALZHEIMER na família: ( ) Sim ( ) Não Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família: ( ) Sim ( ) Não Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ OUTRAS DOENÇAS?: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Alérgico a algum medicamento? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Alérgico a algum alimento? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Teve

DEPRESSÃO? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? ( ) Sim ( ) Não Nome do medicamento (dosagem e frequência) e tempo que utilizou:

---

---

---

---